

Ćwiczenie 15

Środki mutagenne i ich efektywność. Określanie dawki optymalnej. Środki mutagenne w środowisku człowieka.

Prof. dr hab. Roman Zieliński

1. Środki mutagenne i ich efektywność

1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Wymień typy mutacji w zależności od miejsca powstania, wywołującego czynnika i wielkości zmiany.
- 1.1.2. Czy podział na mutacje punktowe i chromosomowe jest zawsze jednoznaczny? w jakim przypadku rozróżnienie może być trudne?
- 1.1.3. Jaki czynnik wywołuje powstanie dimerów pirymidynowych?
- 1.1.4. Jakie typy naprawy występują na świetle i w ciemności?

1.2. Ćwiczenia

1.2.1. Proszę zidentyfikować mutacje punktowe w poniższych sekwencjach DNA (nić sensowna), a następnie podać RNA i efekty na poziomie białka?

- TAT ACC TAT GCT zmienia się na TAT AAC TAT GCT
- TTG CTA ATA GTT zmienia się na TTG CTG ATA GTT
- AAT TAT TGT TGG zmienia się na AAT TAT TGT TGA

1.2.2. CTT jest trypletem na nici DNA będącej matrycą do transkrypcji (antysensowna nić). Korzystając z kodu genetycznego (ćwiczenie 14), podaj:

- kodon, któremu odpowiada powyższa trójka;
- aminokwas który jest przez niego kodowany;
- zaprojektuj mutacje, które doprowadzą do waliny i lizyny.

Samodzielne prawidłowe opracowanie 1.2.2: 2 punkty.

1.2.3. U bakterii zaszła mutacja, która doprowadziła do oporności na niektóre leki. Jak sprawdzić, na które leki bakteria jest oporna? Zaprojektuj doświadczenie.

1.3. Problemy

- 1.3.1. Dlaczego powinniśmy unikać promieniowania ultrafioletowego?
- 1.3.2. Niektóre organizmy są narażone na zwiększone dawki promieniowania ultrafioletowego. Jakie mechanizmy wykształciły te organizmy, aby dostosować się do UV?
- 1.3.3. Środki mutagenne, takie jak promieniowanie jonizujące lub niektóre czynniki chemiczne uważane są za zagrożenie dla życia organizmów. Czy można wyobrazić sobie wykorzystanie tych środków tak aby wspomagały działalność człowieka?

Ćwiczenie można wykonać w grupach i omówić.

2. Określanie optymalnej dawki mutagenu

2.1. Wyjaśnienia

- 2.1.1. Mutageny fizyczne i chemiczne wykorzystuje się do indukowania mutacji w hodowli roślin. Jednym z najczęściej stosowanych środków fizycznych jest promieniowanie jonizujące (gamma). Traktowanie przeprowadza się wykorzystując źródła promieniowania w specjalistycznych jednostkach (np. instytutach fizyki jądrowej), przy czym najczęściej napromieniowuje się nasiona. Natomiast traktowanie mutagenami chemicznymi przeprowadza się w laboratoriach poprzez moczenie nasion w roztworze mutagenu. Przy zachowaniu ostrożności metoda ta jest powszechnie dostępna dla hodowców. Mutageny chemiczne wykazują dużą efektywność w indukowaniu mutacji punktowych.
- 2.1.2. Do najczęściej stosowanych mutagenów chemicznych zalicza się:
 - azydek sodu, NaN_3 , $M = 65 \text{ g/mol}$, wywołuje mutacje punktowe typu tranzycji i transwersji;
 - MNU, $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$, $M = 103 \text{ g/mol}$, związek alkilujący, wywołuje mutacje punktowe.
- 2.1.3. **Dawka optymalna** to taka dawka mutagenu, która wywołuje stosunkowo wysoką częstość mutacji punktowych przy akceptowalnych efektach somatycznych.
 - Każdy mutagen, oprócz efektów genetycznych, wywołuje efekty somatyczne w pierwszym pokoleniu po traktowaniu mutagenem (M_1). W przypadku traktowania nasion, pierwszym pokoleniem są rośliny, które wyrosły z traktowanych nasion.
 - Efekty somatyczne to opóźnienie kiełkowania, późniejszy rozwój, rośliny są niższe, częściowo sterylne i dają niższy plon. Do ich oceny stosuje się proste testy laboratoryjne i polowe, np. kiełkowanie w szalkach Petriego, obserwacja wzrostu w doniczkach lub na wątkach bibułowych.
 - Efekty somatyczne określa się procentowo względem nietraktowanej kontroli.
 - W hodowli dąży się do wybrania takich dawek, aby efekty somatyczne były jak najniższe. Za akceptowalny poziom przyjmuje się efekty na poziomie 30-40%, co oznacza, że wartości mierzonych parametrów są gorsze o 30-40% w porównaniu z kontrolą.

$$\% \text{ redukcji} = \frac{K - M_1}{K} \times 100\%$$

K: kontrola, M_1 : rośliny po traktowaniu mutagenem

2.1.4. Częstość mutacji punktowych oblicza się jako częstość (lub procent) pojawiania się siewek z mutacjami chlorofilowymi, do których należą:

- siewki albinotyczne,
- siewki jasnozielone (*viridis*),
- siewki żółte (*xantha*).

2.2. Ćwiczenia

2.2.1. Traktowanie mutagenem – zasada przeliczeń.

- Celem doświadczenia jest potraktowanie nasion 3-ma dawkami MNU, 2 mM, 1 mM oraz 0.5 mM.
- Do traktowania potrzeba 1000 ml każdego z roztworów, przy czym mutagen należy odważyć tylko raz. Oznacza to, że roztwory należy sporządzić poprzez rozcieńczenia.
- Proszę się zastanowić:
 - A. Od którego roztworu należy zacząć sporządzanie rozcieńczeń?
 - B. Jaka powinna być objętość pierwszego roztworu, aby wystarczyło do przygotowania wszystkich rozcieńczeń?
 - C. Korzystając z podanych w punkcie 2.1 właściwości MNU, oblicz ile MNU należy odważyć?

Samodzielne opracowanie 2.2.1: 2 punkty

2.2.2. Określanie dawki optymalnej.

- W tabelach poniżej podano liczbę mutantów chlorofilowych w pokoleniu M_1 owsa szorstkiego oraz średnie wartości dla cech wykazujących efekty somatyczne dla trzech dawek mutagenu. Na podstawie informacji podanych w punkcie 2.1 określ, która dawka jest optymalna.

Tabela 1. Mutacje chlorofilowe obserwowane w M_1 owsa szorstkiego.

Mutacja	Kontrola	0.5 mM MNU	1 mM MNU	2 mM MNU
Albinotyczne	0	6	9	9
Viridis	0	2	5	5
Xantha	1	1	8	6
Inne	0	2	4	4
Razem				
Liczba badanych siewek	500	483	356	251
Częstość mutacji				

Tabela 2. Efekty somatyczne obserwowane w pokoleniu M₁ owsa szorstkiego (średnia z trzech bloków, po 3 powtórzenia każdy).

Mutacja	Kontrola	0.5 mM MNU	1 mM MNU	2 mM MNU
Długość siewki po 14 dniach	14,8	12,9	10,52	6,32
% redukcji (siewka)	0			
Długość korzenia po 14 dniach	25,9	23,1	17,6	10,95
% redukcji (korzeń)	0			
Średnia redukcja	0			

Wybrana dawka optymalna:

Samodzielne opracowanie 2.2.2: 4 punkty (wypełnienie tabel i podanie dawki optymalnej).

2.3. Problemy

2.3.1. Proszę się zastanowić jakie środki należy zastosować, aby bezpiecznie przeprowadzić traktowanie mutagenem chemicznym?

- Proszę uwzględnić proces traktowania nasion mutagenem oraz późniejszy ich wysiew w doświadczeniach laboratoryjnych i polowych.
- Do którego pokolenia po traktowaniu należy stosować środki ostrożności.

2.3.2. Czy traktowanie mutagenem fizycznym, np., promieniowaniem jonizującym będzie wymagało podobnych zabezpieczeń jak traktowanie mutagenem chemicznym?

3. Środki mutagenne w środowisku człowieka

3.1. Problemy

3.1.1. Jak możemy wyróżnić środki mutagenne w najbliższym otoczeniu? Proszę się zastanowić jak możemy ograniczyć ich wpływ?

3.1.2. Węglowodory aromatyczny należą do związków wywołujących uszkodzenia w DNA, które mogą prowadzić do mutacji. Ich duże stężenie znajduje się w powietrzu zwłaszcza w regionach przemysłowych oraz silnie zurbanizowanych. Zaplanuj krótką kampanię, która uświadomi jak istotne jest unikanie i przeciwdziałanie zanieczyszczeniu powietrza związkami potencjalnie mutagennymi.